

IV. ГЕНЕТИКА И КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

ГЕНЕТИКА МОРФОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ

Л. А. ЛУТОВА, О. Г. КОЗЫРЕВА

В онтогенезе высших растений восстановительная регенерация играет решающую роль в отборе форм, имеющих оптимальную реакцию на повреждение. Способность особи реагировать на повреждения вредителями-насекомыми или бактериями, вызывающими образование галлов, способствует ее выживанию. Эти свойства растений важны в сельском хозяйстве и зависят от их способности к восстановительному и патологическому росту. Поэтому изучение генетики регенерационной способности имеет большое практическое и теоретическое значение. В ходе регенерации у поврежденного растения протекают процессы дедифференциации, каллусообразования, вторичной дифференциации, включающей цитодифференцировку, органогенез и соматический эмбриогенез.

Известна зависимость регенерации от внешних факторов [7], но в меньшей степени освещен вопрос о роли генотипа в этих процессах.

Сравнительный анализ интенсивности регенерации у систематически различных групп организмов проводился многими исследователями [6, 7, 17].

Данные о количественных и качественных различиях по способности к регенерации у представителей одного вида, о выделении мутантов и о наследовании этого признака у гибридов первого и второго поколения появились сравнительно недавно, когда стало возможным стандартизировать условия проведения опытов путем применения метода асептической культуры изолированных органов и тканей растений. Возможность получения каллусов, определяемая генотипом, показана для пшеницы [10], кукурузы [8], ячменя [2], риса [9].

При сравнении исходной линии кукурузы и индуцированных мутантов были выявлены формы, превосходящие исходную линию по способности к каллусообразованию почти в три раза [8]. Эти данные свидетельствуют о наследовании почти трикратно повышенной каллогенеза для мутантов. Для мутантов различных мутантов у культур, получение каллусовых тканей для которых

При получении разных по интенсивности роста каллуса от генотипа исходных растений [2]. Самая высокая способность к органогенезу каллусной культуры была у доминантного мутанта (dsds), самая низкая — у исходного сорта Пискарь.

Анализ влияния каллусообразования на 19 морфологических

линиях пшеницы сорта Чайнз Спринг с использованием питательных сред разного состава [1]. Только две линии вели себя одинаково на двух средах. Выдвинуто предположение о том, что состав среды оказывает влияние на экспрессию генов, определяющих процесс каллусообразования.

Шарма с сотр. [30] нашли генотипические особенности в способности к органогенезу у десяти линий тритикале. В зависимости от генотипа линии тритикале по-разному реагировали на присутствие в среде регуляторов роста: снижалась, увеличивалась или не изменялась скорость регенерации.

Шесть инбредных линий капусты значительно различались по типу и числу образующихся каллусов, по способности к корне- и побегообразованию [22]. Результаты дисперсионного анализа дали возможность утверждать, что эти различия в основном обусловлены генотипом. Показана различная реакция инбредных линий капусты на действие ауксина: регенерационная способность двух линий не изменялась, тогда как у четырех других линий значительно изменялось корне- и побегообразование. Авторы предполагают, что различия между линиями капусты по признакам регенерации могут быть связаны с различиями в эндогенном содержании фитогормонов, определяемых генотипом.

Изучение каллусо- и органогенеза у семи сортов риса, относящихся к видам *Oryza sativa* L. и *Or. glaberrima*, показало, что все сорта успешно образуют каллус, но резко различаются по интенсивности процессов органогенеза [9]. Авторы утверждают, что способность к регенерации не связана с видовой принадлежностью сорта.

Цилиани [21] удалось обнаружить различия сортов картофеля по способности к регенерации побегов.

Анализу внутривидовой изменчивости, характеризующей признаки регенерации, посвящены работы Левенко [11]. Автор культивировал пыльники 50 сортов томатов на различных питательных средах. Сделан вывод о том, что способность пыльников некоторых сортов образовывать каллус в значительной степени определяется генотипом.

Результаты изучения внутривидовой изменчивости по процессам регенерации последнее время используются в селекции, в частности для оценки экологической пластичности сортов [20]. Изменение внешних условий вызывает перераспределение активности значительной части генома. Величина этой реакции зависит от особенностей генотипа, поэтому следует ожидать сходства стабильности ростовых показателей *in vivo* и *in vitro*. Так, среди нескольких сортов яровой пшеницы удалось найти сорта наиболее и наименее отзывчивые на смену условий выращивания культуры.

В лаборатории генетики растений Биолог. НИИ ЛГУ ведется изучение внутривидовой генотипической изменчивости по признакам, объединяемым под общим понятием регенерация. Работы выполнены на генетических коллекциях редиса, томатов, гороха и земляники. Изучение регенерационных процессов у эксплантатов проростков гороха показало наличие межсортовых и межлинейных различий в процессах каллусо- и корнеобразования [16]. Выделены инбредные линии с высокой и низкой частотой каллусообразования, а также линии, различающиеся по типу каллуса.

Внутривидовая изменчивость по регенерационным признакам у инбредных эксплантатов семидолей и гидрокотилей. Показаны качественные различия по признакам регенерации и способности образовывать корни и почки, и слабо дифференцированные и слабо дифференцированные каллусы. Наличие таких линий позволило изучить наследование признаков регенерации у гибридов первого и второго поколений [3].

Целый ряд работ выполнен на редисе [12, 13, 18 и др.]. Показано, что семядоли разных инбредных линий редиса имеют различный характер регенерации. Выделены линии, контрастные по размеру и типу каллуса, по степени увеличения размера семядоли, типу и интенсивности корнеобразования. Полученные данные, характеризующие изменчивость признаков регенерации, позволили провести генетический анализ признаков регенерации.

ИЗУЧЕНИЕ ПРИЗНАКОВ РЕГЕНЕРАЦИИ У ГИБРИДОВ ПЕРВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Для двух из четырех исследованных инбредных линий кукурузы показана способность образовывать каллус при культивировании эндосперма на среде Уайта [31]. Реципрокные гибриды этих линий образуют каллус лучше, чем обе родительские линии. Авторы предполагают существование по крайней мере двух генетических факторов, связанных с каллусообразованием. Их фенотипическое проявление зависит от условий культивирования. Одна из линий, не образующих каллус, вероятно, содержит ингибитор каллусообразования.

Оки с соавт. [29] изучали почкообразование у двух линий томатов и передачу этой способности гибридам первого поколения. Оптимальные концентрации стимуляторов почкообразования отличались у разных линий и гибридов. Одна из родительских линий имела более высокую органогенную способность, чем другая. Анализ реципрокных гибридов этих двух линий показал, что характер проявления признака у гибридов зависит от состава среды и направления скрещивания. В зависимости от взаимодействия этих факторов наблюдали материнский тип наследования, гетерозис и неполное доминирование. Авторы предполагают, что различия между двумя линиями томатов и их гибридами по способности к почкообразованию определяются взаимодействием генома, цитоплазмы и эндогенных фитогормонов.

При исследовании 19 дителоцентрических линий пшеницы Чайниз Спринг установлено, что отсутствие одного из плеч у определенных хромосом снижает интенсивность образования каллусов и почкообразования. Способность к каллусообразованию изучена также у инбредных линий ржи [1]. Для ряда гибридов первого поколения отмечен промежуточный эффект каллусообразования по сравнению с родительскими формами и наличие реципрокных различий между гибридами первого поколения.

Изучение органогенеза у первичного эксплантата межвидового гибрида (*Nicotiana silvestris* × *Nicotiana glauca*) позволило сделать предположение, что образование цветков у регенерантов является результатом взаимодействия геномов, так как ни один из родителей не был способен к цветковому морфогенезу *in vitro* [24].

Анализ межлинейных гибридов первого поколения у редиса показал доминирование способности к корне- и каллусообразованию, а также соответствие типа каллуса на культивируемой семядоле гибридов F₁ типу каллуса материнской линии [12].

У междорговых гибридов первого поколения томатов выявлено доминирование по признакам: корнеобразование на культивируемой семядоле и образование дифференцированного каллуса на участках гипокотыля. По разрастанию культивируемой семядоли, каллусообразованию на изолированной семядоле и участках гипокотылей, по типу каллуса на участках гипокотылей и корнеобразованию были обнаружены реципрокные различия, что дало основание предполагать участие материнской цитоплазмы в определении признаков регенерации [3].

ИЗУЧЕНИЕ ПРИЗНАКОВ РЕГЕНЕРАЦИИ У ГИБРИДОВ ВТОРОГО ПОКОЛЕНИЯ

В литературе очень мало данных по анализу признаков регенерации у гибридов F_2 , что связано со сложностью анализа наследования этого явления, его полигенным контролем.

При изучении генетического контроля образования растений-регенерантов из каллуса люцерны были использованы два клона, обладающих одной низкой и одной — высокой регенерационной способностью [23]. В F_1 и F_2 , а также поколениях возвратных скрещиваний наблюдали расщепление, анализ которого свидетельствует о наличии двух доминантных генов, контролирующих дифференциацию почек. Для получения 75%-ной регенерации требуется наличие обеих доминантных аллелей. Два доминантных гена обозначены символами R_{n1} и R_{n2} .

На выделенной из каллусной культуры гаплоида *Nicotiana silvestris* клеточной линии изучено наследование способности к росту и каллусообразованию на селективных средах, содержащих стрептомицин [27]. Из каллусных клеток, устойчивых к антибиотику, регенерировали диплоидные растения. Эти растения имели пигментную недостаточность. В F_1 у растений-регенерантов наблюдали чувствительность к антибиотику, а в F_2 — расщепление 3:1 (чувствительность — устойчивость). Предполагается, что стрептомицин-устойчивость клеточной линии является результатом ядерной рецессивной мутации. Существует и другой тип мутаций стрептомицин-устойчивости, для которого характерно наследование по материнскому типу и который, следовательно, предполагает локализацию генетических детерминант чувствительности в хлоропластах [28]. Следует подчеркнуть актуальность проведения таких работ. Использование мутантов цветковых растений по устойчивости к антибиотикам позволит в дальнейшем выяснить механизмы взаимодействия ядерных и хлоропластных генов. Кроме того, мутации устойчивости могут быть маркерами при соматической гибридизации [27].

Генетический анализ наследования цитокинин-зависимости проведен в культуре ткани фасоли [25]. Выявлены генотипические различия по этому признаку среди линий *Phaseolus vulgaris* и *Ph. lunatus*.

Анализ гибридов F_1 и F_2 между цитокинин-зависимой и двумя цитокинин-независимыми линиями *Ph. vulgaris* показали, что этот признак контролируется одним геном.

Линии гибридов F_2 различались по признаку способность к корнеобразованию. Анализ расщепления, соответствующее моногенной или дигенной схеме наследования [14, 15]. По этому признаку обнаружены различия между линиями, в которых влияние материнской формы на формирование гибридов контролируется одним геном.

Авторы предполагают, что рецессивные различия в способности к образованию корней являются результатом влияния одного гена, влияющий на процесс корнеобразования.

Оказалось, что по каллусообразованию изученные линии различаются по крайней мере по одному гену. Анализ совместного наследования этих признаков выявил независимый характер их определения. Наследования признаков корнеобразования изучали также на изолированных линиях второго поколения гибридов, различающимися по способности к корнеобразованию, обнаружено расщепление, соответствующее моногенной схеме наследования [3, 4].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При анализе литературных данных очевидно, что работ по генетике регенерации, и особенно у первичных эксплантатов, недостаточно. Авторы большинства известных работ обсуждают лишь внутривидовую изменчивость процессов регенерации, реже — протекание таких процессов у гибридов F_1 . Это следствие распространенного мнения о том, что способность к регенерации является признаком полигенным и сложным для генетического анализа. Однако несомненно, что анализ морфогенетических потенций растений в сочетании с методами генетического анализа дает возможность подойти к изучению многих проблем генетики и, в частности, генетики развития растений. Кроме того, многие сельскохозяйственные культуры размножаются вегетативно, что требует отбора форм с высокими регенерационными потенциями.

Особый интерес генетика регенерации представляет для работ по культуре клеток растений, гибридизации соматических клеток и генетической инженерии, поскольку успех получения растений-регенерантов зависит от используемых мутантов. При подборе форм для соматической гибридизации необходима предварительная оценка исходных родительских форм по способности к регенерации. Генетические исследования создадут условия для целенаправленного подбора форм при гибридизации соматических клеток и выращивании гибридных растений.

Summary

Genetic aspects of plant regeneration processes are reviewed. The main aspects of discussion are intraspecific quantitative and qualitative variations of regeneration ability, the survey of forms with altered regeneration potential and inheritance of regeneration ability. The significance of data about genetic control of regeneration ability for somatic hybridization and plant genetic engineering is discussed.

УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ермишин А. П. Изучение каллусной культуры пшеницы и ржи с целью использования в селекционно-генетических исследованиях: Автореф. канд. дис. Минск, 1980. 24 с.
2. Картель Н. А., Манешина Т. В. Регенерация растений ячменя в культуре каллусной ткани. Физиология растений, 1977, т. 25, вып. 2, с. 283—287.
3. Козырева О. Г. Генетика признаков каллусообразования и корнеобразования у изолированных органов томатов и редиса: Автореф. канд. дис., 1980. 19 с.
4. Козырева О. Г., Брач Н. Б. Генетический и феногенетический анализ корнеобразования у томатов в культуре. II Всесоюз. совещание по генетике соматических клеток в культуре: Тез. докл. М., 1983, с. 67.
5. Козырева О. Г., Войлоков А. В., Никандрова О. В. Индукция образования почек и корней у разных сортов томатов. Культура клеток растений и биотехнология: Тез. докл. Кишинев, 1983, с. 48.
6. Кренке П. П. Хирургия растений. М., 1928. 657 с.
7. Кренке П. П. Регенерация растений. М.; Л., 1950. 672 с.
8. Кунах В. А., Ченцова Т. П., Мордун В. В. Получение каллусных тканей из разных по генотипу растений кукурузы. Физиология растений, 1980, т. 27, вып. 2, с. 399—403.
9. Кучеренко Л. А., Мамаева Г. Г. Каллусогенез и органогенез в культуре тканей различных сортов риса. Сельскохозяйственная биология, 1980, т. 15, вып. 3, с. 84—93.
10. Левенко Б. А., Юркова Г. Н., Кунах В. А., Легейда Б. С. Поведение пыльников пшеницы и ржи в изолированной культуре. — В кн.: Экспериментальная генетика растений. Киев, 1977, с. 123—131.
11. Левенко Б. А., Юркова Г. Н., Кунах В. А. Культивирование пыльников томатов *in vitro*. Сообщ. I. Изучение условий каллусообразования. Апомиксис и птоэмбриология растений, 1978, вып. 4, с. 67—68.
12. Литова Л. А. Изучение генетики регенерации редиса в условиях асептической культуры: Автореф. канд. дис., 1977. 26 с.
13. Литова Л. А., Нарбут С. И., Фадеева Т. С. Изучение особенностей регенерации у гибридных линий и гибридов первого поколения редиса. — В кн.: Культура клеток растений. Труды II Всесоюз. конф. Киев, 1978, с. 292—295.

14. Лутова Л. А., Верзина И. И. Наследование признаков регенерации у редиса в условиях асептической культуры изолированных органов. IV съезд ВОГиС им. Н. И. Вавилова: Тез. докл. Кишинев, 1982, с. 54—55.
15. Лутова Л. А., Верзина И. И. Наследование способности к каллусо- и корнеобразованию у изолированных семядолей редиса в условиях асептической культуры. Генетика, 1984.
16. Мурашко Л. Н., Фадеева Т. С. Изучение характера регенерации у различных форм гороха. Вестн. Ленингр. ун-та, 1973, № 15, с. 132—140.
17. Токин Б. П. Регенерация и соматический эмбриогенез. Л., 1959. 268 с.
18. Фадеева Т. С., Нарбут С. И., Лутова Л. А. Изменчивость по признаку корневых и каллусообразования у изолированных семядолей редиса и морфологические особенности растений. — В кн.: Исследования по генетике. Л., 1975, вып. 6, с. 135—146.
19. Фадеева Т. С., Лутова Л. А., Козырева О. Г. Регенерация как метод анализа функции гена. — В кн.: Исследования по генетике. Л., 1977, вып. 7, с. 130—142.
20. Хотылева Л. В., Ермишин А. П. Применение метода культуры изолированных тканей для оценки экологической пластичности сортов растений. — В кн.: Экологическая генетика растений и животных. Тезисы докладов. Всесоюз. конф., ч. 2. Кишинев, 1981, с. 156.
21. Цилосани Г. М. Исследование фенотипических и генотипических характеристик регенерантов картофеля, полученных из первичного каллуса in vitro методами морфологии, биохимии и вирусологии: Автореф. канд. дис., 1980, Л., 21 с.
22. Baroncelli S., Buiatti M., Bennici A. Genetics of growth and differentiation in vitro of *Brassica oleracea*. Z. Pflanzen., 1973, vol. 70, p. 66—107.
23. Bingham E. The genetic control of bud formation from callus cultures of diploid alfalfa. 1980, Plant Sci. Lett., vol. 1, N 20, p. 71—78.
24. Kamate K., Cousson A. Influence des facteurs genetique et physiolog chez le *Nicotiana* sur la neoformation in vitro de fleurs a partir d'assises cellulaires epidermiques et sous epidermiques. Can. J. Bot., 1981, vol. 55, N 5, p. 755—761.
25. Mc Machteld C., Mc David W. Cytokinin autonomy in tissue cultures of phaseolus: a genotype — specific and heritable trait. Genetics, 1980, vol. 94, N 3, p. 675—679.
26. Maliga P. Streptomycin resistance in inherited as a mendelian trait in a *Nicotiana sylvestris* line. Theor. Appl. Genet., 1981, vol. 60, N 1, p. 191—193.
27. Maliga P. Isolation, characterization and utilization of mutant cell lines in higher plants. Intern. Review of Cytology, 1980, vol. 11A, N 9, p. 255—261.
28. Menczel L., Nagy F., Kiss Zs., Maliga P. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* *Nicotiana knightiana*: N. tabacum plastids correlation of resistance. Theor. Appl. Genet., 1981, vol. 59, N 3, p. 191—209.
29. Ohki S., Mousseau L., Bigot P. Analysis of shoot-forming capacity in two lines of tomato and their hybrids. Plant and Cell Physiology, 1978, vol. 19, N 1, p. 27—42.
30. Sharma G., Bello L., Sapra V. Genotypic differences in organogenesis from callus of ten triticales lines. Euphytica, 1980, vol. 29, N 3, p. 751—758.
31. Tabata M., Motoyoshi F. Heredity control of callus formation in maize endosperm cultured in vitro. Japan J. Genetics, 1965, vol. 40, N 5, p. 343—355.

НЕКОТОРЫЕ МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ ПЛАСТИДНЫХ МУТАЦИЙ

Ю. Д. БЕЛЕЦКИЙ

Установлено, что N-нитрозо-N-метилмочевина [НММ] эффективно индуцирует пластидные мутации у подсолнечника и ряда других высших растений [3; 6; 28]. Пластомные мутанты подсолнечника представлены главным образом пестролистными растениями, которые характеризуются материнским наследованием мутантного признака, неманделиевым расщеплением в потомстве на зеленые, пестрые, желтые и белые проростки, наличием на границе между нормальной и мутантной тканями гетеропластидных клеток и изменением ультраструктуры мутантных пластид [1; 17—18].

Индуктированный мутагенез хлоропластов дает возможность решать ряд теоретических и практических задач, в том числе исследовать механизмы образования пластидных мутаций. В качестве подхода к изучению формирования мутаций пластид мы использовали модификацию